

TRANSLATION CERTIFICATION

We, **AD-EX WORLDWIDE**, an industrial translation service founded in 1957, domiciled at 525 Middlefield Road, Suite 150, Menlo Park, California 94025-3458, USA, do hereby certify that:

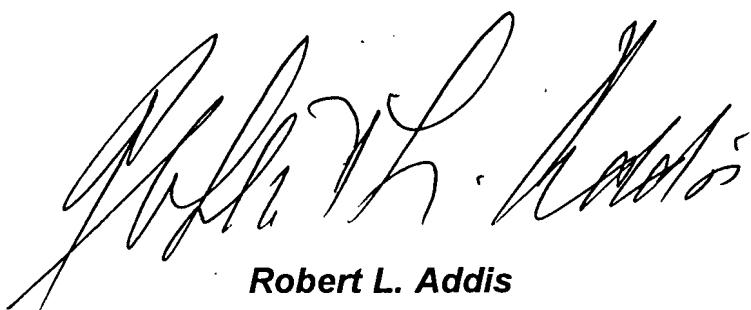
- we are internationally recognized professional translators from Japanese into English;
- we have been serving the public in that capacity since 1957;
- the attached 13-page English text, each of whose pages is identified by JP(A)59-44648, is a translation from Japanese to English entirely performed by us;
- said English translation from Japanese constitutes a complete and accurate description of the entire meaning of the printed portions of the original Japanese-language text identified as

Japanese Patent Application Public Disclosure No. 59-44648
(a 6-page document with pages numbered from 239 to 244)

of which a copy is appended to this English translation.

So declared with such exceptions as may be indicated in the translation.

Thus certified for and on behalf of **AD-EX Worldwide** by its Certifying Officer:



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Robert L. Addis".

Robert L. Addis

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開
 ⑪ 公開特許公報 (A) 昭59-44648

⑫ Int. Cl. ³ G 01 N 27/26 33/48 G 01 T 1/08 G 21 H 5/02	識別記号 A 7363-2G Z 8305-2G 8105-2G 8204-2G	⑬ 公開 昭和59年(1984)3月13日 発明の数 1 審査請求 未請求
--	--	---

(全 6 頁)

⑭ デオキシリボ核酸の塩基配列決定方法	熊谷市拾六間829-6
⑮ 特願 昭57-155550	⑯ 出願人 株式会社三双製作所
⑰ 出願 昭57(1982)9月7日	東京都千代田区内神田1丁目12番13号
⑱ 発明者 佐藤隆	⑲ 代理人 弁理士 湯浅恭三 外4名

明細書

1 [発明の名称]

デオキシリボ核酸の塩基配列決定方法

2 [特許請求の範囲]

一端を放射性元素でラベルしたDNA断片に各塩基特異的切断を行ない、その切断によつて得られたDNAフラグメントサンプルを電気泳動してラベルされた多数のDNAフラグメントをオートラジオグラフィで検出することからなるDNA断片の塩基配列決定方法において各塩基特異的な切断をした4種類のDNAフラグメントサンプル全部を混合した対照サンプルを1つ置きに並べ、その間に塩基特異的な切断をしたDNAフラグメントサンプルを置き、電気泳動して、そのサンプルの両側の対照サンプルの泳動結果から、塩基特異的切断を行なつた1つのサンプル中のDNAフラグメントのラインでの一つずつ塩基の数の違うゾーンの泳動されてくる位置を予測し、その位置に該当するゾーンがその塩基特異的な切断をしたサンプルのラインに存在するかどうかを判断して、

そのサンプル中の多数のDNAフラグメントの泳動位置を決定し、塩基特異的切断を行なつた他の各サンプル中の多数のDNAフラグメントについても同様な操作を行なうことにより、塩基特異的切断を行なつたその他のサンプル中の多数のDNAフラグメントの位置を決定し、それによつて塩基特異的切断を行つた各フラグメントの順序を決定することを特徴とするDNA断片の塩基配列の決定方法。

3 [発明の詳細な説明]

本発明は電気泳動によるデオキシリボ核酸(DNA)の塩基配列決定方法に関する。

本明細書で言う「DNA断片」とはマキザムーゼルバード(Maxam-Gilbert)法などを用いて、DNA塩基配列を決定するために試料として用いる、数百塩基対から成るDNAをさし、生体中に存在する環状あるいは線形の巨大DNAを制限酵素などを用いて切断したものという。「DNAフラグメント」とは、マキザムーゼルバード法などを用いて、DNA断片を所定の方法で塩基特

異的に切断したときにできる個々の長さのものをいう。「DNAフラグメントサンプル」とは、DNA断片を塩基特異的に切断したときにそれぞれできる、各種長さのDNAフラグメントの混合物をいう。

最近の分子生物学、遺伝子工学の発展に伴ない、DNAの塩基配列決定の必要性が急速に高まっている。事実マクサム-ギルバード(Maxam-Gilbert)法をはじめとするいくつかの塩基配列決定法が開発された。

ところでマクザム-ギルバート法においては、一端を放射性元素 [^{32}P] でラベルしたDNAを塩基特異的に、化学的に切断、すなわちT(チミン)、C(シトロン)、G(グアニン)、A(アデニン)の位置で、特異的に切断したDNAフラグメントのサンプルを、ポリアクリルアミドゲルの所定の位置に左から右へとならべ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なうことにより、1塩基ずつの長さの違いによって分離し、オートラジオグラフィーを行なう(図-1)。したがつてオ

ーンの移動量の差は、非常に小さくなり、精度の高い位置測定が要求される。

ところが、今までのところ、マクザム-ギルバート法によるオートラジオグラム上のゾーンの自動読み取り、解析のシステム化ははかられておらず、人間が肉眼的にゾーンの位置を比較、決定しているにすぎない。

ところで、DNA塩基配列、自動読み取り、解析システムを作ろうとした場合に、一つの大きな問題点が存在する。すなわち、ポリアクリルアミドゲルの重合の不均一さ、あるいは電気泳動中に不均一に電場がかかるなどの理由で、泳動分離されたDNAフラグメントのゾーンが泳動方向に対して正確に直角にならず、曲がつたり、並んだりしてしまうことである(図-1)。ところが、この歪みは電気泳動の性質上、除去することは、難しい。その歪みの一例を誇張して示すと、図-2のように、Gのゾーンは泳動方向に対し直角になつてゐるが、このゾーンはいくらか左側の部分が右側の部分より泳動された量が少なく、左上がり

ー、オートラジオグラム上にあらわれたゾーンの位置は、それぞれの塩基がDNA中のどの位置に存在しているかに対応しており、遠くまで移動したゾーンほど、その特異的切断をされた塩基がDNA中の末端近くに存在することになる。したがつて実際には、最も遠くまで移動したゾーンから、順次どの塩基の部分で切断を行なつたDNAフラグメントであるかを調べ、DNAの塩基配列を決定する方法である。

この方法では、 $20 \times 40\text{ cm}$ のポリアクリルアミドゲルを用いて 200 ~ 250 程度の塩基の配列を決めることができると言われているが、そのためには、オートラジオグラム上で、それぞれの塩基の位置で特異的に切断したDNAフラグメントの移動距離(ゾーンの位置)を測定し、他のDNAフラグメントの移動距離と比較する必要がある。この際DNAフラグメントの移動距離は、フラグメントの大きさの対数に逆比例していることが知られており、したがつてDNAフラグメントのサイズの比較的大きい領域では、それぞれのゾ

ーンの移動量の差は、非常に小さくなり、精度の高い位置測定が要求される。

ところが、今までのところ、マクザム-ギルバート法によるオートラジオグラム上のゾーンの自動読み取り、解析のシステム化ははかられておらず、人間が肉眼的にゾーンの位置を比較、決定しているにすぎない。

ところで、DNA塩基配列、自動読み取り、解析システムを作ろうとした場合に、一つの大きな問題点が存在する。すなわち、ポリアクリルアミドゲルの重合の不均一さ、あるいは電気泳動中に不均一に電場がかかるなどの理由で、泳動分離されたDNAフラグメントのゾーンが泳動方向に対して正確に直角にならず、曲がつたり、並んだりしてしまうことである(図-1)。ところが、この歪みは電気泳動の性質上、除去することは、難しい。その歪みの一例を誇張して示すと、図-2のように、Gのゾーンは泳動方向に対し直角になつてゐるが、このゾーンはいくらか左側の部分が右側の部分より泳動された量が少なく、左上がり

に傾いている。さらにTのゾーンは、その傾きの程度が、Cよりもはげしくなつていて。このような歪みが認められた場合、肉眼によるゾーンの順番決定の際には、まず、TのゾーンのCの方向への延長線を考え、その延長線がCのゾーンよりも上に来るか下に来るかを判断する。次いで、同様にしてCとGのゾーンの相対位置も決定する。(この場合の局所的塩基配列はTCG)。このゾーン位置の決定を機械的に行なう一番簡単な方法はそれぞれのゾーンの中点の位置(y座標)を測定し、その値を比較し、ゾーンの順番を決める方法であるが、図-2にあげた例では、T、C、Gそれぞれのゾーンの中点を y_T 、 y_C 、 y_G とすれば $y_T > y_C > y_G$ となり、この測定の座標軸の取り方を考慮すると、yの値の小さいものほど遠くまで泳動されたことになるので、この場合の局所的塩基配列はGCTとなり、明らかに肉眼でゾーンの順番を決定した場合と異なる。

このように、DNA塩基配列自動読み取り装置においては、単純にオートラジオグラム上の各ゾ

ーンの中点を正確に測定しても無意味で、特にDNAフラグメントの大きい領域においては、肉眼的にゾーンの相対位置を決定する場合に相当するような、何らかのゾーンの歪みに対する補正方法を開発する必要がある。この方法ではポリアクリルアミドゲル電気泳動のためのサンプルのならべ方は、T、C、G、Aそれぞれの塩基での特異的な切断を行なつたDNAフラグメントサンプルを順次左から右へとならべていた(図-1)。このようなサンプルの配列を用いて電気泳動をした結果得られたオートラジオグラム上のDNAフラグメントゾーンの位置決定は、不完全な電気泳動に起因するゾーンの歪み、曲がりが存在した場合には、「従来技術の欠点」の項で論じたように、読み取りが不正確になり、何らかの形で補正をかける必要がある。この補正のかけ方の第1の方法は、肉眼での読み取りの際に行なう補正と全く同じことをコンピュータを用いて行なう方法である。すなわち、図-2において、Tのゾーンの左端と右端の座標を求め、その値を用いて、このゾーンの

C方向への延長線を計算する。この延長線とCゾーンの中点の位置とを比較し、どちらのゾーンの方がより速くまで泳動されたかを判断する。

このような操作をT、C、G、Aすべてのゾーンについてくり返し、各ゾーンの順番を決めることは可能である。しかしそのための計算量はかなり多く、また大きな記憶容量のコンピュータが必要となるばかりでなく、測定ポジション数も増すので、誤差も大きくなるなどの欠点がある。

本発明においては、サンプルは図-2に示すとおり、各塩基に特異的な切断を行なつたDNAフラグメントのそれぞれの両側に4種の塩基特異的な切断を行なつたDNAフラグメント全部の混合物を対照としてならべることにより、ゾーン位置の歪みによる誤差の補正を簡略化する。

本発明は、一端を例えば[³²P]からなる放射性元素でラベルしたDNA断片に各塩基特異的切断を行ない、その切断によつて得られたDNAフラグメントサンプルを電気泳動して、ラベルされた多数のDNAフラグメントをオートラジオグラ

フィで検出することからなるDNA断片の塩基配列決定方法において各塩基特異的な切断をした4種類のDNAフラグメントサンプル全部を混合した対照サンプルを1つ置きに並べ、その間に塩基特異的な切断をしたDNAフラグメントサンプルを置き、電気泳動してそのサンプルの両側の対照サンプルの泳動結果から、塩基特異的切断を行なつた1つのサンプル中のDNAフラグメントのラインでの一つずつ塩基の数の違うゾーンの泳動されてくる位置を予測し、その位置に該当するゾーンがその塩基特異的な切断をしたサンプルのラインに存在するかどうかを判断して、そのサンプル中の多数のDNAフラグメントの泳動位置を決定し、塩基特異的切断を行なつた他の各サンプル中の多数のDNAフラグメントについても同様な操作を行なうことにより、塩基特異的切断を行なつた。その値のサンプルの多数のDNAフラグメントの位置を決定し、それによつて塩基特異的切断を行なつた各フラグメントの順序を決定することを特徴とするDNA断片の塩基配列の決定方法に関

する。

一つのDNAフラグメントサンプルに含まれた多数のDNAフラグメントの泳動位置と他のサンプルに含まれたDNAフラグメントの泳動位置は第3図に示されるように5つの対照サンプルの間に4つのDNAフラグメントサンプルを並べて同時に測定しても良いが、別々に測定しても良い。

ほとんどの電気泳動の不完全さによるゾーンの歪み、曲がりは図-4示すように、ゲルの側面に近いものほど泳動距離が短く、したがつてゲルの左側の部分では左上がりの傾き、またゲルの右側の部分では、右上がりのゾーンが形成されるので、対照1と対照2のそれぞれ第n番目のゾーンの位置 y_n 、 y'_n の位置を正確に測定し、そのy座標の値の平均 $\bar{y}_{Tn} = (y_n + y'_n)/2$ を求める。この \bar{y}_{Tn} はTのラインでの、n個のヌクレオチドから成るDNAフラグメントの泳動されて来る位置を示していることになる。次いでTのラインの中に、この位置に相当するゾーンが存在するかどうかを判断する。図-4に示した例では該当するゾーン

ーンは存在しない。図-4のTのラインの例では、対照1、T、対照2のゾーンは、泳動方向に対し、ほぼ同じだけ傾いていたので、上記の方法で求めたTラインでのn個のヌクレオチドより成るDNAフラグメントの泳動されて来るべき位置は、本来Tライン上でこの大きさのフラグメントを泳動した場合に、泳動されて来る位置と全く同じになることは数学的にも明確である。ところが図-4の対照2、C、対照3のように、それぞれのゾーンの傾きが、少しずつ異っている場合（経験的に傾きの大きさは対照2>C>対照3となつてゐる）には、計算で求めたCラインでの泳動位置 $\bar{y}_{cn} = (y'_n + y''_n)/2$ と、実際にn個のヌクレオチドから成るDNAフラグメントが泳動されて来る位置 y_{cn} とは、わずかだがずれてゐる。しかしこのずれの程度は、隣接する長さの違うDNAフラグメントの泳動されて来る位置との差に較べはるかに小さいので、ある範囲内（例えば隣接するゾーンとの位置の違いの±0%以内）におさまれば、そのゾーンが存在すると判断してよい。

かどうかを調べるために、3つの連続するゾーンn、n+1、n+2の位置 y_n 、 y_{n+1} 、 y_{n+2} の間に次の式が成立するかどうかをチェックする。

$$Y_{n+2}-Y_{n+1} < Y_{n+1}-Y_n \quad (n=1, 2, 3 \dots)$$

この式が成立しない場合は、n+1番目とn+2番目のヌクレオチドの間に化学修飾された塩基が存在することになるので、この塩基の位置を記憶し、以後の計算において、塩基数と補正を行なう。

4-2 DNA中のTの位置の決定

デシントメーターを用いて、図-2の対1、T、対2のラインのゾーンの中点（ y'_n 、 y_{1n} 、 y''_n n=1、2、3…）をそれぞれ測定し、コンピュータに記憶する。対1と対2のそれぞれ対応する番号のゾーンの位置の平均（ \bar{y}_{Tn} 、n=1、2、3…）をとる。記憶されたTのゾーンの中点の位置（ y_{Tm} m=1、2、3…）の中に、 \bar{y}_{Tn} と次の関係にあるものをさがす。

$$1 y_{Tm} - \bar{y}_{Tn} 1 < 0.31 \bar{y}_{Tn} - \bar{y}_{Tn+1} 1 \quad (n=1, 2, 3 \dots, m=1, 2, 3 \dots)$$

このようなゾーンが存在した場合、その時のnの値の

このように、直接塩基特異的な切断を行なつたDNAフラグメントのゾーン相互の位置を比較するのではなく、サンプルの両側に必ず対照をおき、これらの対照から一つずつ長さの違うDNAフラグメントが、サンプルのラインのどの位置に泳動されて来るかを予測し、その位置にDNAフラグメントのゾーンが存在するかどうかを判断することにより、効果的に、しかも簡単に不完全な電気泳動に伴なう歪み、曲がりを補正することができる。

本発明のデータ解析の手順の1例を示すと次の通りである。

デシントメーターとそれに接続したコンピュータを用い、次の測定、計算を行なう。

4-1 化学修飾された塩基の存在の有無のチェック

図-3において、対1のラインを矢印の方向にスキャンし、それぞれのゾーンの中点の位置を読み取り、記憶する。このDNA中に化学的に修飾をうけ、したがつて切断されない塩基が存在する

ところにTが存在するとして記憶する。このnの値は、DNAの末端から第n番目のヌクレオチドがTであることを示している。

4-3 DNA中の他の塩基の位置決定

図-3の対2と対3を用いて、4-2と同じ方法でCの位置、対3と対4からG、対4と対5からAの位置を決め、それを記憶する。

4-4 DNA塩基配列の決定

記憶した、それぞれの塩基の位置（番号）のデータの中から、順次第1番目、第2番目…に対応する塩基を呼び出し、その順番をプリントアウトする。

4-5 相補的なDNA鎖を用いての塩基配列の確認

以上述べた方法でDNAの塩基配列を決定することができるが、実験に伴なう誤差などにより、データの解析に誤りが生じる可能性がある。ここで確実性を増すために、図-5に示すように、塩基配列を決定しようとしているDNAとそれに相補的なDNAとのサンプルのセットを、一枚のボ

リアクリルアミドゲルの上にならべて泳動し、上記の方法で解析することにより得られた2組のDNAの塩基配列を、それぞれのDNAの切断位置、DNAの大きさ等を考慮した上で、相補性が成立しているかどうか、即ちA-T、G-C対が塩基配列の上で成立しているかどうか調べる。もし相補性が成立していない場合は、その旨表示する。

4 [図面の簡単な説明]

第1図はマクサムーギルバート法によるポリアクリルアミドゲル上のサンプルのならべ方を示す概略図である。T、C、G、Aは、それぞれの塩基に特異的な切断を行なつたDNAフラグメントサンプルである。

第2図はゾーンに歪み、曲がりがおこつた場合の測定の不正確さを示す概略図である。 y_T 、 y_C 、 y_G はそれぞれのゾーンの中点を示す。

第3図は本発明におけるポリアクリルアミドゲル上のサンプルのならべ方を示す概略図である。対1~5は、T、C、G、A4種のサンプルを混合したものである。

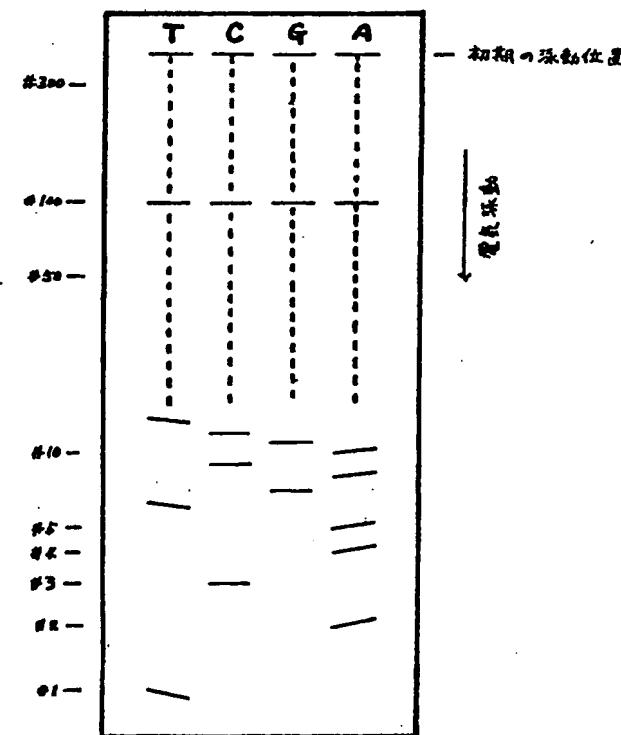
第4図は本発明におけるゾーンの歪み、曲がりの補正の概念図である。

第5図はDNAの相補性の確認をする際のポリアクリルアミドゲル上のサンプルのならべ方を示す概略図である。

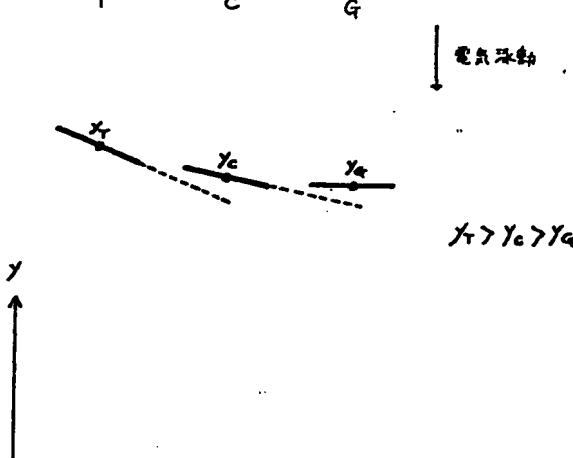
特許出願人 株式会社三双製作所

代理人弁理士湯浅恭
(外5名)

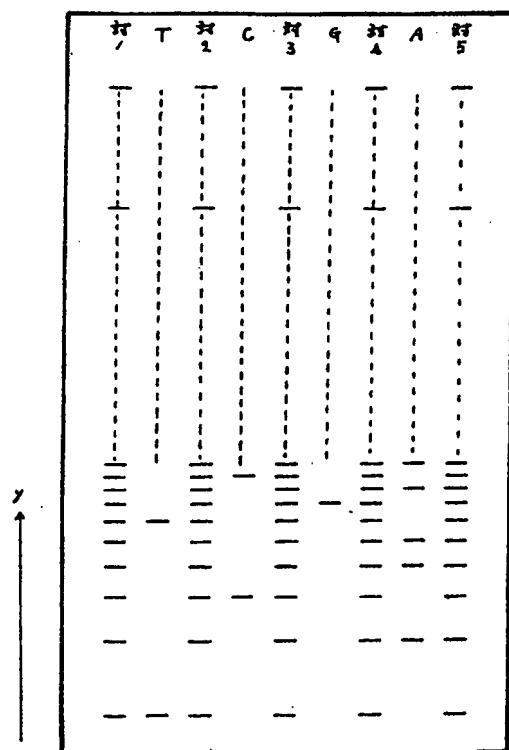
第1図



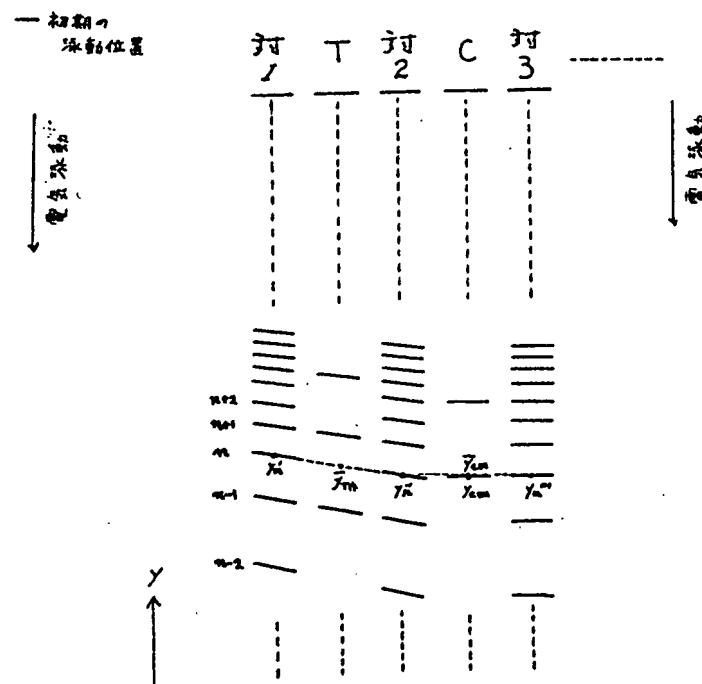
第2図



第3図



第4図



第5図

